

**EIN MODELLVERSUCH ZUM
FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN SCREENING
GONOSOMALER ABERRATIONEN**

**– Zytogenetischer Befund bei
fluoreszenzmikroskopischem Y-Screening
von 366 Neugeborenen –**

119

Friedrich Legiehn

1976

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. H. S p i e s s

EIN MODELLVERSUCH ZUM FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN
SCREENING GONOSOMALER ABERRATIONEN

- Zytogenetischer Befund bei fluoreszenzmikroskopischem Y-Screening von 366 Neugeborenen -

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der

Ludwig Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Friedrich Legiehn

aus

Königsbrunn

1 9 7 6

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Murken
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Spiess
Dekan:	Prof. Dr. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	14.12.1976



INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Seitenzahlen

1. Einleitung

1.1. Zielsetzung

1.1.1. Zwecksetzung und Zielsetzung

1.1.2. Zielsetzung und Zielsetzung

1.1.3. Zielsetzung und Zielsetzung

1.1.4. Zielsetzung und Zielsetzung

1.2. Zielsetzung

1.2.1. Zielsetzung

1.2.1.1. Zielsetzung und Zielsetzung

1.2.1.2. Zielsetzung und Zielsetzung

1.2.1.3. Zielsetzung und Zielsetzung

Meiner Frau und meinen Kindern gewidmet.

1.2.1.4. Zielsetzung

1.2.1.4.1. Zielsetzung und Zielsetzung

1.2.1.4.2. Zielsetzung und Zielsetzung

1.2.1.4.3. Zielsetzung und Zielsetzung

1.2.1.4.4. Zielsetzung und Zielsetzung

1.2.1.4.5. Zielsetzung und Zielsetzung

1.2.1.4.6. Zielsetzung und Zielsetzung

1.2.1.4.7. Zielsetzung und Zielsetzung

1.3. Zielsetzung

1.3.1. Zielsetzung und Zielsetzung

1.3.2. Zielsetzung und Zielsetzung

1.3.3. Zielsetzung und Zielsetzung

1.4. Zielsetzung

INHALTSÜBERSICHT

=====

1. EINLEITUNG

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Kurzer Überblick über die Entwicklung
zytogenetischer Methoden

2.2 Das Y-Chromosom im Lichte der neuen
Fluoreszenzmethode

2.2.1 Numerische Veränderungen

2.2.2 Strukturelle Veränderungen

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Methode

3.1.1 Allgemeine Einführung

3.1.2 Methode und Material für das Screening

3.2 Untersuchungen an postmortalem Gewebe

4. AUSWERTUNG

4.1 Ergebnisse des Screening

4.2 Befunde beim Kind A.

4.2.1 Anamnese des pathologischen Befundes

4.2.2 Zytogenetischer Befund

4.2.3 Sektionsbefund

4.2.4 Histologischer Befund

4.2.5 Zytogenetischer Befund aus Untersuchungen
an postmortalem Gewebe

4.2.6 Untersuchung der Eltern des Neugeborenen A.

5. DISKUSSION

5.1 Ergebnisse des Screening

5.2 Diskussion des Falles A.

5.3 Kritik der Methode

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. E I N L E I T U N G

WALDEYER bezeichnete im Jahre 1888 intensiv-färbbare, faden- und schleifenförmige Bestandteile des Zellkerns als Chromosomen. Im Laufe der Zeit ist es gelungen, mit verschiedenen Farbstoffen Kernbestandteile und auch einzelne Chromosomen zur Darstellung zu bringen. Die besondere Affinität einzelner Chromosomenabschnitte zu manchen Farbstoffen führte schließlich zur Identifizierung aller Chromosomen.

1949 entdeckten BARR und BERTRAM bei Untersuchungen an der Nissl-Substanz zufällig, daß sich bei vielen Säugetieren und beim Menschen ein geschlechtsspezifisches feulgenpositives Chromatinkörperchen in den Kernen vieler Gewebe weiblicher Individuen darstellen ließ. Inzwischen ist die Bestimmung des Kerngeschlechts, bei der es um die Auffindung des weiblichen Geschlechtschromatins geht (z. B. in den Leukozyten), selbstverständlicher Bestandteil genetischer Diagnostik geworden.

Durch Arbeiten von CASPERSSON et al. sowie PEARSON und BOBROW ist es im Jahre 1970 gelungen, eine analoge Methode zur Bestimmung des männlichen Kerngeschlechts zu entwickeln.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, diese Methode bei der zytogenetischen Untersuchung an einer auslesefreien Serie von 366 Neugeborenen anzuwenden, mit dem Ziel, etwaige gonosomale Aberrationen festzustellen.

2. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

2.1 Kurzer Überblick über die Entwicklung zytogenetischer Methoden

WINIWARTER kam 1912 aufgrund seiner Untersuchungen an Schnitten von Testes und Ovarien zu dem Ergebnis, daß die Frau 46 Autosomen sowie 2 X-Chromosomen, also den Karyotyp 48 XX, der Mann hingegen 46 Autosomen und nur ein X-Chromosom (47 X) besitze. 1921 entdeckte PAINTER beim Mann ein zweites Geschlechtschromosom und bezifferte 1923 auch den männlichen Chromosomensatz auf 48.

Wie allen auf dem Gebiete der Genetik tätigen Wissenschaftlern jener Zeit standen ihnen nur Schnittpräparate bei der Auszählung von Chromosomen zur Verfügung.

Auf normalen Schnittpräparaten wird:

1. ein zu geringer Anteil von Zellen in der Mitose angetroffen und
2. liegen die Chromosomen zu dicht beieinander oder überschneiden sich, ein Faktor, der die Genauigkeit der Auszählung beeinträchtigt (MURKEN, WILMOWSKI).

KEMP führte 1929 Gewebekulturen in die Chromosomenanalyse ein. Damit war auf lange Sicht die Möglichkeit gegeben, zur Verbesserung der Untersuchungsbedingungen in vitale Mechanismen regulierend einzugreifen.

HSU brachte 1952 sein Gwebematerial durch Behandlung mit hypotoner Lösung zum Quellen. Dadurch verbreiteten sich die Chromosomen auf einer größeren Fläche und waren so besser auszählbar.

1956 gelang es TJIO und LEVAN durch Anreicherung von Metaphasen mit Hilfe eines Alkaloids der Herbstzeitlosen, Colchizin, die erstere der oben aufgeführten Schwierigkeiten zu überwinden.

Sie wiesen dann nach, daß die Zahl der Chromosomen im diploiden menschlichen Chromosomensatz 46 ist. Als Material benutzten sie Quetschpräparate von Lungenfibroblasten menschlicher Embryonen, die sie mit saurem Orcein färbten. Mit dieser Färbung sowie mit den anderen einfachen Chromosomenfärbungen (saures Karmin, GIEMSA-Färbung, Unna Blau) ließen sich 7 Chromosomen als Karyotyp identifizieren.

In Fortentwicklung der von PELC 1947 eingeführten Methode der Autoradiographie hat TAYLOR 1957 erstmals Tritium-markiertes Thymidin in die DNA von Pflanzenchromosomen eingebaut und so die Autoradiographie der genetischen Diagnostik zugänglich gemacht. Nachdem diese Methode auch Eingang in die Humangenetik gefunden hatte, war die Erkennung 6 weiterer Chromosomen möglich.

1960 erkannte NOWELL, daß sich das zur Abtrennung der Leukozyten von Erythrozyten verwandte Phytohämagglutinin als zuverlässiges Mittel zur Mitosestimulierung in menschlichen und tierischen Lymphozyten eignete. In demselben Jahr entwickelten MOORHEAD et al. unter Verwendung des Phytohämagglutinins die nach ihm benannte Methode zur routinemäßigen Durchführung der Chromosomenanalyse.

Nach dieser bahnbrechenden Entwicklung in der Humangenetik folgte ein längerer Stillstand. Es wurden zwar auf der Basis der entwickelten Methoden Erkenntnisse

gesammelt, aber ein wesentlicher Fortschritt in den Methoden der Humangenetik war nicht zu verzeichnen.

Das änderte sich, als CASPERSSON et al. vom Karolinska Institut in Stockholm 1968 Beobachtungen an Metaphasechromosomen, die mit dem Acridinderivat Quinacrin-Mustard gefärbt waren, veröffentlichten.

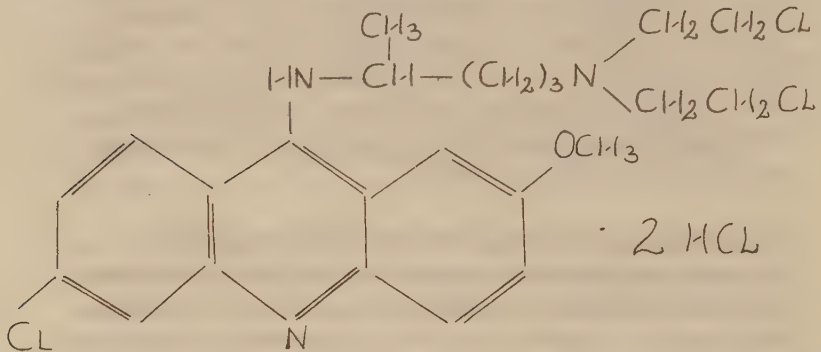


Abb. 1: Quinacrin-Mustard

Es handelte sich um Chromosomen von Bohnen (*Vicia faba*) und solche von chinesischen Hamstern. Die Autoren stellten fest, daß jedes Chromosomenpaar im Fluoreszenzauflicht eine für diese spezifische Verteilung von besonders intensiv fluoreszierenden Banden entlang dem Chromosom aufwies. Es folgte eine Reihe von Veröffentlichungen zu diesem Thema. Mit Hilfe des durch Quinacrin-Mustard erzeugten Banden-Musters konnten schließlich alle Chromosomen identifiziert werden (4 th. Chromosome Standardization Conference 1972, Paris).

1969 erwähnte LORE ZECH, daß nach Färbung mit Quinacrin-Mustard das Y-Chromosom in der Metaphase leicht zu identi-

fizieren sei, da sich das distale Ende des langen Arms des Y-Chromosoms durch eine besonders starke Fluoreszenz auszeichne.

PEARSON und BOBROW stellten daraufhin 1970 fest, daß sich das Y-Chromosom auch in Interphasekernen durch Anfärbung mit Quinacrin-Dihydrochlorid als fluoreszierender Punkt, sogenanntes "fluorescent body" oder F-body, darstellen ließ.

2.2 Das Y-Chromosom im Lichte der neuen Fluoreszenz- methode

2.2.1 Numerische Gesichtspunkte -----

Bereits 1960 berichteten MULDAL und OCKEY von einem "double male" Individuum mit dem Karyotyp 48 XX YY. SANDBERG und Mitarbeiter waren ein Jahr darauf die ersten, die den Träger einer 47 X YY Konstellation entdeckten. In den Jahren von 1965 bis 1970 wurde eine Reihe von Untersuchungen an Kollektiven durchgeführt.

Ihr Ziel war es, durch Chromosomenanalysen u. a. die Häufigkeit von X YY-Konstellationen sowohl in sozial auffälligen Gruppen (JAKOBS 1965, CASEY 1966, genetische Abteilung der Kinderpolyklinik der Universität München 1968), als auch in auslesefreien Serien (SERGOWICH, JAKOBS u. a.) festzustellen.

Wenn sich auch die Chromosomenanalyse im Screening größerer Kollektive bewährt hat, so ist sie doch mit

einem relativ großen Aufwand an Zeit und Material verbunden. Die Fluoreszenzmethode mit der das Y-Chromosom auch in Interphasekernen zu identifizieren war, eröffnete neue Möglichkeiten. Mit einem geringen apparativen und zeitlichen Aufwand konnten große Kollektive auf das männliche Geschlechtschromosom sowie auf die 47 X YY-Konstellation hin untersucht werden.

Es boten sich die Zellen verschiedener Gewebe an. PEARSON und BOBROW benutzten zuerst die Abstrichpräparate von der Mundschleimhaut. Mit demselben Gewebe arbeiten MAJEWSKI et al. und HELLWEG-FRÜND et al. in größeren Untersuchungsreihen.

SCHWINGER wertete Abstriche von Haarwurzeln aus, BARLOW und VOSA Spermien, POLANI und MUTTON Lymphozyten und GREENSHER et al. Fibroblasten der Wharton'schen Sulze. Auch in der pränatalen Diagnostik hat sich die Quinacrin-Färbung von Interphasekernen als nützlich erwiesen. KHUDD und BENIRSCHKE berichten über Untersuchungen mit dieser Methode an Zellen aus der Amnionflüssigkeit.

2.2.2 Strukturelle Gesichtspunkte

Die Entdeckung der spezifischen Anfärbbarkeit verschiedener Chromosomenbereiche mit dem Fluorochrom Quinacrin-Mustard warf die Frage auf, worin sich diese Bezirke von den anderen anfärbbaren unterscheiden. Eine besonders starke Fluoreszenz an einigen Stellen zeigen die Chromosomen 3, 13-15 und wie erwähnt das Y-Chromosom (CASPERSSON et al.). CASPERSSON und seine Gruppe stellten fest, daß die stark fluoreszierenden Bereiche ähnlich wie die heterochromatischen Bezirke einen späten Einbau

von Tritium-markiertem Thymidin in der S-Phase des Zellkerns zeigten.

Die Vermutung, daß es sich besonders auch bei dem fluoreszierenden Teil des Y-Chromosoms um Heterochromatin handelte, lag nahe.

Sie wurde erhärtet, als ARRHIGI und HSU 1971 durch eine Spezialfärbung das Heterochromatin menschlicher Chromosomen darstellten. Dabei erwies sich der stark fluoreszierende Anteil des langen Arms vom Y-Chromosom als heterochromatischer Bereich.

COHEN et al. hatten 1966 Unterschiede in der Länge des Y-Chromosoms bei verschiedenen Rassen festgestellt.

BORGAONKAR und HOLLANDER berichteten 1971, daß sich in Interphasekernen von Zellen männlicher Individuen mit besonders kleinem Y-Chromosom trotz normalem Karyotyp und Phänotyp kein fluoreszierender spot zeigte.

Untersuchungen von BOBROW et al. sowie SCHNEDL bezüglich der Längenvariabilität des Y-Chromosoms ergaben, daß die Längenunterschiede durch Größenänderungen des fluoreszierenden Anteils bedingt waren. Der nicht fluoreszierende Bereich bleibt gleich lang. BRITTEN und KOHNE hatten nachgewiesen, daß Heterochromatin aus dauernd sich wiederholenden Basensequenzen, der repetitiven DNA, zusammengesetzt ist.

Es lagen also folgende Beobachtungen vor:

1. Der distale fluoreszierende Abschnitt des langen Arms des Y-Chromosoms ist heterochromatisch, d. h. setzt sich aus repetitiver DNA zusammen.

2. Die Länge des Chromosoms ist variabel, wobei kein Zusammenhang zwischen Längenvariabilität auf der einen und phänotypischer Ausprägung auf der anderen Seite festzustellen ist.
3. Der variable Anteil des Y-Chromosoms entspricht dem fluoreszierenden Bereich.

Daraus folgt der Schluß, daß der fluoreszierende Anteil für die spezifisch männliche Ausprägung des Phänotyps unbedeutend ist (PEARSON). Da das Y-Chromosom für die männliche Merkmalsausbildung, insbesondere die Differenzierung der Gonaden zu Testes und die daraus folgende Entwicklung des männlichen Urogenitalsystems verantwortlich ist, muß der maskulinisierende Chromatinbereich an anderer als der fluoreszierenden Stelle des Y-Chromosoms liegen.

Vermutlich liegt er auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms. Es sind phänotypisch weibliche Individuen beschrieben, deren Karyotyp ein Isochromosom des langen Arms vom Y-Chromosom aufweist (JAKOB et al.). Hier wäre dann der Testisdifferenzierende Anteil der kurzen Arme des Y-Chromosoms verlorengegangen.

Ein zweites Y-Chromosom in der Konstellation 47 X YY spielt bei der Ausprägung des spezifisch männlichen Phänotyps keine Rolle. Es ist möglich, daß es analog dem Y-Chromosom bei der Frau inaktiviert wird (MURKEN). Autoradiographische Untersuchungen stützen diese These. Die physische und soziale Auffälligkeit solcher Individuen wäre dann auf verminderte Frustrationstoleranz infolge gestörter Genbalance zurückzuführen (MURKEN). Welche Funktion der heterochromatische Anteil des Y-Chromosoms innehat, konnte bisher nicht geklärt werden. Es ist nur bekannt, daß er in einer Be-

ziehung zum Nukleolusapparat des Zellkerns steht (BOBROW, PEARSON).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Methode und Material für das Screening

3.1.1 Allgemeine Einführung

Die Methode geht von der Beobachtung aus, daß bei der Anfärbung von Metaphasechromosomen mit dem Acridinderivat Quinacrin-Mustard (2.1) unter dem Fluoreszenzmikroskop ein für jedes Chromosom spezifisches Bandenmuster auftritt (CASPERSSON). In Interphasekernen erscheint nach Anfärbung mit Quinacrin-Dihydrochlorid im Fluoreszenzauflicht ein hell leuchtender Punkt (PEARSON, BOBROW). In Individuen mit der Konstellation 47, X YY sind zwei sogenannte F-bodies (F = fluorescent) zu erkennen, während dieses Phänomen in der Regel bei weiblichen Individuen nicht zu beobachten ist. Damit liegt es nahe, daß das F-body in Interphasekernen das Y-Chromosom repräsentiert. Der intensiv fluoreszierende Punkt entspricht dem distalen 1/3 des langen Y-Chromosomenarms.

Es wurde vermutet, daß sich das Farbstoffmolekül des Quinacrin-Mustard in die Doppelhelix der DNA einschiebt. Ferner sollen H-Bindungen, alkylierende Effekte sowie ein Angriff auf das N-7 Atom des Guanins eine Rolle spielen.

Nach neueren Forschungsergebnissen spielen sich die entscheidenden Vorgänge bei der Färbung in der Eiweißhülle der DNA ab (PEARSON).

3.1.2 Methode und Material für das Screening

In der Zeit vom 1. Juli 1972 bis März 1973 stellten die Kreißsäle der 1. Frauenklinik der Universität freundlicherweise Nabelschnursegmente von Neugeborenen zur Verfügung.

3.1.2.1 Die Nabelschnüre wurden mit einer Rasierklinge durchgeschnitten und von der Schnittfläche je zwei Abstriche der Wharton'schen Sulze auf Objektträger gebracht. Es war darauf zu achten, daß Verunreinigungen sowie starke Blutbeimengungen auf den Abstrichen vermieden wurden, damit bei der Färbung die Fibrozyten einwandfrei zu erkennen waren.

3.1.2.2 Die beiden Abstriche wurden in absolutem Alkohol 10 Minuten lang fixiert.

3.1.2.3 Die Färbung erfolgte in 0,5 % Atebrin-Lösung für die Dauer von 3 Minuten.

3.1.2.4 Die gefärbten Präparate wurden unter fließendem Leitungswasser einige Male abgespült.

3.1.2.5 Die Präparate standen 20 Minuten lang in Aqua dest. und wurden anschließend mit Aqua dest. als feuchter Kammer eingedeckt. Bei zu schwacher Fluoreszenz unter dem Mikroskop war eine Neufärbung möglich.

An optischer Ausrüstung stand das Mikroskop Orthoplan der Firma Leitz mit dem Lampenhaus 250 und dem Auflichtilluminator nach Ploem zur Verfügung. Das Erreger-

spektrum von 495 nm wurde von der Quecksilberhöchst-drucklampe HBO 200 W mit vorgeschaltetem Erregerfilter BG 12 und BG 38, fest eingebautem FO-Sperrfilter K 510 und K 530 geliefert.

Für Fotografien mittels der automatischen Aufsatzkamera "Orthomat" (Fa. Leitz) wurde für die Schwarz-Weiß-Aufnahmen der Film FP 4 der Firma Ilford (DIN 22) benutzt. Die Belichtungszeit betrug im Mittel 3 Minuten.

Im Fluoreszenzauflicht stellten sich die Y-Chromosomen als hell-leuchtende spots in der Größe von 0,25 - 1 Mikron im Durchmesser dar. Auch das heterochromatische X-Chromosom (barr-body) war in einzelnen Zellen weiblicher Neugeborener als schwach fluoreszierender Fleck am Kernrand zu erkennen (ca. 1 - 3 Mikron im Durchmesser), aber in Größe und Intensität der Fluoreszenz deutlich vom Y-body zu unterscheiden.

Es wurden 50 Zellen je Neugeborenem ausgezählt und die Beobachtungen (spots, barr-bodies, Verunreinigungen, evtl. Unklarheiten) protokolliert. Die Geschlechtsbestimmung erfolgte anhand der Beobachtungen. Darauf wurde die Richtigkeit der getroffenen Geschlechtsdiagnose durch Vergleich mit dem im Geburtenbuch verzeichneten Geschlecht überprüft. Bei Differenzen zwischen Geburtsgeschlecht und der aufgrund der Beobachtungen getroffenen Diagnose war eine Chromosomenanalyse angezeigt.

Die Zellen wurden nach folgenden Gesichtspunkten eingeteilt:

- a) Zellen mit einem spot (F-body) in der Zellebene, der sich klar von der übrigen Fluoreszenz abhebt und zentral gelegen ist.

- b) Zellen mit einem spot (F-body) in der Zellebene, der an der Pheripherie des Kerns gelegen ist.
- c) Zellen mit zwei weiter auseinanderliegenden spots.
- d) Zellen mit einem Duplex-Körperchen, in dem die beiden Fluoreszenzpunkte nicht weiter voneinander entfernt sind als der Durchmesser eines spots (ca. 0,25 - 1 Mikron).
- e) Zellen ohne spot (negative Zellen).
- f) Zellen mit einem barr-body, der sich als schwach fluoreszierender Fleck am Kernrand zu erkennen gibt.

3.2 Untersuchungen an postmortalem Gewebe

Es wurde notwendig, einen Befund, der sich während der Arbeit ergab, durch Untersuchungen an postmortalem Gewebe zu verifizieren. Dazu eignete sich die Anfärbung von Schnitten aus formalin-fixiertem Gewebe mit Quinacrin-Dihydrochlorid, wie sie von KHUDD und BENIRSCHKE angegeben wird (persönliche Korrespondenz).

- 3.2.1 Es werden Paraffinschnitte von Formalin-fixiertem Gewebe (6 Mikron) auf Objektträgern hergestellt.
- 3.2.2 Die Präparate werden für 2 Minuten in Xylol deparaffinisiert und kurz in Alkohol von 70 % und 95 % eingetaucht. Dann stehen sie 24 Stunden lang in absolutem Alkohol.

- 3.2.3 Die Präparate werden 2 Minuten lang mit einem Essigsäure-Methanol Fixativ im Verhältnis 1 : 3 behandelt und anschließend luftgetrocknet.
- 3.2.4 Es folgt eine Inkubation in modifiziertem Mc Ilvaine Puffer bei 60°C eine Stunde lang. Der Puffer setzt sich zusammen aus 86, 3ml einer 0,1 mol. Zitronensäure und 113, 7ml einer 0,2 mol. Disodium-Phosphatlösung. Der pH liegt bei 5,5.
- 3.2.5 Nach Inkubation werden die Präparate bei Raumtemperatur mit demselben Puffer umspült und mit Quinacrin-Hydrochlorid 0,15 % in destilliertem Wasser 15 Minuten lang gefärbt. Darauf folgt eine Spülung unter fließendem Wasser für 10 Minuten. Anschließend werden sie in Pufferlösung gestellt.
- 3.2.6 Die Auswertung erfolgt mit der unter 3.1.2 angegebenen Apparatur.

4. A U S W E R T U N G

4.1 Ergebnisse des Screening

Bei 366 Neugeborenen wurden in der Zeit vom 1. Juli 1972 bis 31. März 1973 insgesamt 16762 Zellkerne untersucht. Davon waren 168 weiblich mit 8024 Zellen und 186 männlich mit 8738 Zellkernen.

Die Atebrinfärbung (Quinacrin-Hydrochlorid) machte die Fibroblasten der Wharton'schen Sulze im Fluoreszenzauflicht sichtbar. Der Kern hob sich in seiner dichten, homogenen Fluoreszenz leuchtend von dem nur schwach gefärbten Protoplasma der übrigen Zelle ab.

29 (7,92 %) der Nabelschnurabstrichpräparate wiesen defekte Zellen auf. Bei 12 Präparaten davon waren die Zellen so weitgehend zerstört, daß sie nicht ausgewertet werden konnten. Das kann damit zusammenhängen, daß infolge zu langer Lagerung die Autolyse des Nabelschnurgewebes bereits eingesetzt, oder auch eine bakterielle Zerstörung stattgefunden hatte. Ebenso ist eine mechanische Zerstörung bei der Präparation nicht auszuschließen.

15,6 % der Präparate waren verunreinigt. In den meisten Fällen handelte es sich um bakterielle Verunreinigungen, die sich störend in der Suche nach dem F-body auswirkten. Die Bakterien waren meist etwas größer und tendierten im Farbton nach orange. Trotzdem war eine eindeutige Unterscheidung zwischen den mehr hellgrünen F-bodies und Bakterien nicht immer möglich. Besonders bei Abstrichen von weiblichen Neugeborenen war durch fluoreszierende Bakterien die Gefahr einer falschen Geschlechtsdiagnose gegeben.

Bei 5 Neugeborenen wurde eine Chromosomenanalyse durchgeführt. In diesen Fällen war aufgrund der Beobachtungen an Interphasekernen weibliches Geschlecht diagnostiziert worden (s. Tab. 1), während im Geburtenbuch männliches Geschlecht verzeichnet war.

Tabelle 1 erlaubt einen Überblick über die Abstrichpräparate der 5 Neugeborenen, bei denen eine Chromosomenanalyse durchgeführt wurde.

Tabelle 1

Zellen mit 1 F-body	18	2	7	16	7
Negative Zellen	32	45	41	34	41
Zellen mit einem Duplex-Körperchen					1
Zellen mit 2 spots					1
Zellen mit einem barr-body		3			

Die Chromosomenanalysen erbrachten durchweg ein normales, unauffälliges Chromosomenbild.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die Zahl der F-body negativen Zellen von 64 % - 90 % variierte. In den Kernen des Präparats von Fall Nr. 1 war eine granulierte bis schollige Chromatinstruktur zu erkennen. Wahrscheinlich ist sie dafür verantwortlich, daß nicht mehr F-bodies gefunden wurden. Das Präparat von Fall Nr. 2 war bakteriell verunreinigt. Im 3. Fall war die Färbung intensiv, so daß die Fluoreszenz der F-bodies eventuell überdeckt wurde. In Präparat Nr. 4 zeigten sich schlierige Verunreinigungen, die eine Diagnose erschwerten. Im 5. Fall war das Präparat sauber und die Zellen lagen in Gruppen.

Die meisten der insgesamt ausgezählten Kerne dieses Screenings waren abgesehen von barr- und F-bodies durch

eine homogene Fluoreszenz gekennzeichnet. In 38 Präparaten (10,38 %) zeigten die Fibrozytenkerne eine auffallend schollige Chromatinstruktur.

Bei 8738 untersuchten Zellkernen männlicher Neugeborener waren in 6523 Kernen (74,7 %) F-bodies zu erkennen (inklusive Duplex-Körperchen und zwei F-bodies im Kern), wobei die Streuung F-body negativer Kerne pro Präparat 44 % - 100 %, der Mittelwert 66 % - 90 % betrug. Es waren also Präparate vorhanden, in denen nur 44 % der Kerne ein F-body zeigten, während in anderen Präparaten in allen Kernen ein solches erkennbar war.



Abb. 2: ein zentral und ein peripher im Kern gelegenes F-body in Fibroblastenkernen

In 59,7 % der Nabelschnurabstriche männlicher Neugeborener zeichneten sich die spots durch eine besonders intensive Fluoreszenz aus. Die Y-bodies waren hier zudem scharf konturiert und erlaubten so eine schnelle, einwandfreie Diagnose.

Präparate männlicher Neugeborener
in %

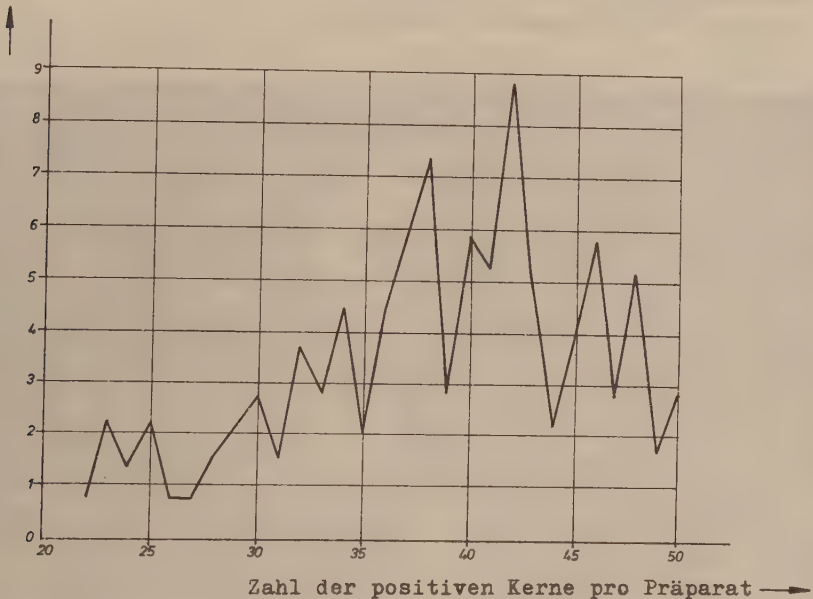


Abb. 3: Häufigkeitsverteilung der positiven Kerne in den Präparaten männlicher Neugeborener.

In 139 (2,13 %) der F-body positiven Kerne zeigte sich ein Duplex-Körperchen. Die beiden fluoreszierenden Punkte standen dicht beieinander (Entfernung 1 Mikron).

Zwei Y-spots, deren Entfernung voneinander größer als der Durchmesser eines F-bodies (1 Mikron) war, sah man in 68 Kernen männlicher Neugeborener (1,04 % der positiven Zellen) und in 6 weiblichen Kernen.

6,7 % der 7630 negativen weiblichen Zellen wiesen ein barr-body auf. Die Größe dieser Gebilde variierte von ca. 1 Mikron - 3 Mikron. Sie waren in der Fluoreszenz schwächer als F-bodies, hoben sich aber deutlich von der übrigen diffusen Kernfluoreszenz ab.



Abb. 4: Zwei Fibroblastenkerne mit "barr-bodies"

Von den 8024 analysierten weiblichen Kernen war in 394 Fällen ein Y-spot zu sehen (4,9 %). Diese spots unterschieden sich in Größe und Intensität der Fluoreszenz nicht von denen männlicher Kerne.

Tabelle 2

	männlich		weiblich	
	absolut	%	absolut	%
untersuchte Neugeborene	186	100	168	100
untersuchte Zellen	8738	100	8024	100
F-body-positiv (gesamt) davonn	6523	74,70	394	4,92
a) F-body zentral gelegen	5081	77,83	322	81,75
b) F-body peripher gelegen	1230	18,88	57	14,45
davon Duplexkörperchen	139	2,13	9	2,28
davon 2 F-bodies	68	1,04	6	1,52
davon mehr als 2 F-bodies	5	0,12	-	-
F-body-negativ (gesamt) davon	2215	25,35	7630	95,08
a) kein F-body, kein barr-body	2207	99,91	7118	93,30
b) barr-bodies	8	0,09	512	6,70

4.2. Befunde beim Kind A.

4.2.1. Zytogenetischer Befund

Unter den Präparaten bei denen die Geschlechtsdiagnose vom Geburtsgeschlecht differierte, war das des weiblichen Neugeborenen A. mit folgendem Protokoll:

F-BODY POSITIVE KERNE	35
DUPLEX-KÖRPERCHEN	1
ZWEIFACHES F-BODY	1
NEGATIVE ZELLEN	13

Tabelle 3: Zytogenetischer Befund des Neugeborenen A.

Da der Anteil von 70 % positiven Kernen in der Zellreihe dem eines normalen männlichen Neugeborenen entsprach, während das Geburtenbuch weibliches Geschlecht angab, war eine Chromosomenanalyse angezeigt. Das Neugeborene war jedoch kurz nach der Geburt verstorben, so daß kein Blut für die Chromosomenanalyse zur Verfügung stand.

4.2.2. Anamnese des pathologischen Befundes

Das Kind wurde 12 Tage nach dem errechneten Termin geboren. Es hatte ein Geburtsgewicht von 2950 g, eine

Länge von 50 cm und war phänotypisch weiblich. Post partum war eine weiße Asphyxie festzustellen. Der Apgar betrug 5. Die linke Lunge war nicht belüftet, das Herz nach rechts verlagert. Röntgenaufnahmen ergaben den Verdacht auf Zwerchfellhernie. Trotz Beatmung und Acidosebehandlung stellte sich keine Besserung ein und das Kind starb 3 Stunden später an Herz-Kreislaufversagen.



Abb. 5: F-body in einem Fibroblastenkern des Neugeborenen A.

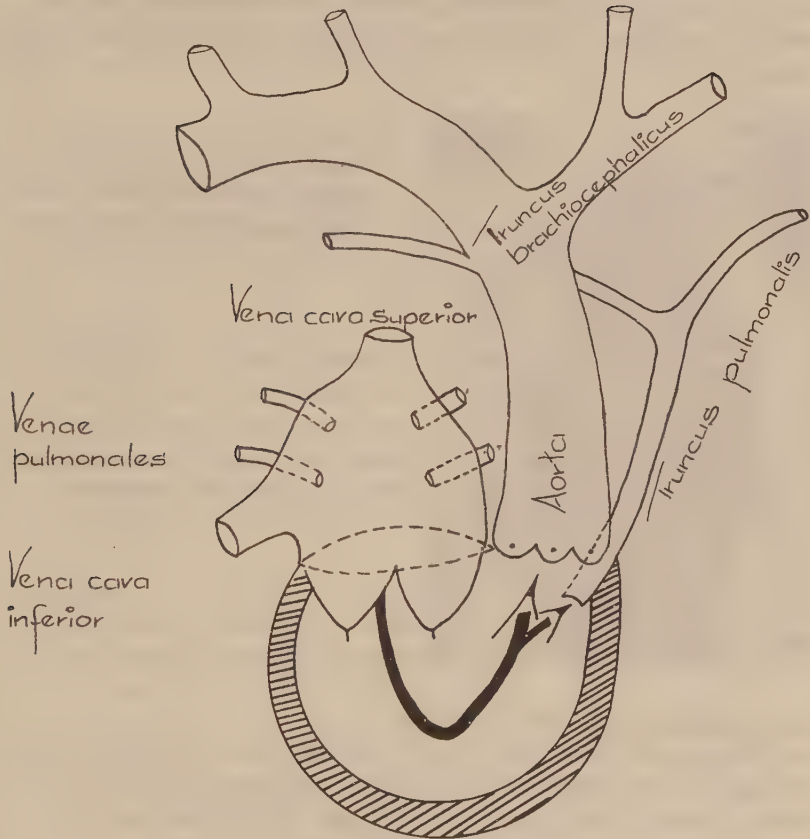
4.2.3 Sektionsbefund

Die Sektion des Kindes A. wurde im pathologischen Institut der Universität München durchgeführt. Der Befund, der freundlicherweise vom Institut zur Verfügung gestellt wurde, ergab:

a) primitive Herzmißbildung:

Cor biloculare: Einmündung der großen Körper- und Lungenvenen in einen gemeinsamen, gering erweiterten Vorhof. Die Atrioventrikularklappe war zweizipfelig. Die normal weite Aorta (Umfang ca. 1,5 cm) nahm ihren Ursprung aus einem gemeinsamen Ventrikel. Der Aortenbogen verlief nach rechts. Es war ein spiegelbildlicher Abgang der großen Körperarterien aus dem Aortenbogen mit einem linksseitigen Truncus brachiocephalicus vorhanden. Normale Aortentaschenklappen mit regelrechtem Abgang von zwei Coronararterien wurden gefunden. Ein hochgradig hypoplastischer Truncus pulmonalis entsprang 8 mm unterhalb des Aortenursprungs. Es waren hypoplastische, aber regelrecht konfigurierte Pulmonalisklappen vorhanden. Ein ductus Botalli fehlte.

Abb. 6: Skizze der Herzmißbildung



b) Circumscripte Zwerchfellagenesie:

mit einem zentral sitzenden Defekt von 5 x 4 cm und mit Verlagerung des linken Leberlappens, des Magens, der Milz, des gesamten Dünndarms, sowie des Colon transversums in die linke Brusthöhle. Ein Bruchsack war nicht vorhanden.

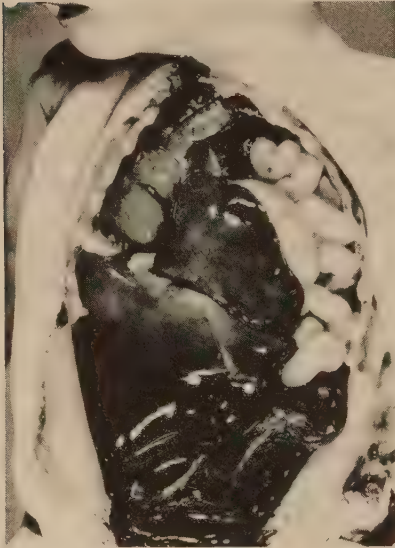


Abb. 7:

Sektionsbefund Zwerchfellhernie

c) Mißbildungen im Genitalbereich:

Der Uterus war mäßig hypoplastisch, die Tuben normal angelegt. Auffällig war die ovarielle Dysgenesie. Der rechte Ureter wies 3 cm unterhalb des Nierenbeckens eine Stenose mit mäßiger prästenotischer Dilatation auf (mäßiger Hydroureter).

d) sonstige Beobachtungen:

Es zeigte sich eine fein- bis mitteltropfige, vorwiegend zentrale Leberverfettung. In der vollständigen Plazenta von 470 g Gewicht waren mehrere kleine Infarkte und multiple Verkalkungen zu finden.

4.2.4 Histologischer Befund

Die histologischen Organschnitte, die freundlicherweise vom Pathologischen Institut der Universität München zur Verfügung gestellt wurden, ergaben folgende Befunde:

a) Lunge

Im Lungenpräparat zeigte sich starke Blutfüllung der Kapillaren und Gefäße. Die Alveolen waren teilweise verklebt. In den Alveolar- und Bronchiallumina fand sich hyalinhaltiges Material, das auch die Alveolarwände auskleidete. Es fiel eine starke Infiltration basophil granulierter Zellen auf.

b) Leber

Die Leber zeigte eine mäßige, fein- bis mitteltropfige, vorwiegend zentrale Leberzellverfettung der Parenchymzellen.

c) Placenta

Hier waren multiple Infarkte und Verkalkungen zu erkennen.

d) Die übrigen Präparate von Herz, Nabelschnur, Milz, Tube, Niere, Pankreas, Nebenniere waren unauffällig.

4.2.5 Zytogenetischer Befund aus Untersuchungen an postmortalem Gewebe (siehe 3.1.3)

a) Vorversuche

Es wurden zwei Vorversuche an Schnitten eines männlichen Individuums durchgeführt, um festzustellen, inwieweit man mit der Methode nach KHUHR und BENIRSCHKE F-bodies in postmortalem Gewebe erkennen konnte.

Im ersten Vorversuch wurden Ultradünnschnitte angefertigt und die Methode folgendermaßen modifiziert.

1. statt 24 Stunden eine 4-stündige Alkoholinkubation
2. 1 Stunde Inkubation in Mc Ilvaniepuffer bei 85°C statt bei 60°C.
3. 5 Minuten Färbung in Quinacrin-Mustard, statt Quinacrin-Hydrochlorid

Die Parenchymzellen von Leber und Niere zeigten zu starke Fluoreszenz. Dagegen eigneten sich Fibrozyten gut zu Analysen. F-bodies waren nur in 5 - 10 % der Zellen zu erkennen. In der Regel waren es weniger. Die Fluoreszenz der F-bodies war nicht so deutlich wie in vitalen Zellen.

Im zweiten Vorversuch wurden Präparate von 6 Mikron Schichtdicke nach der unter 3.1.3 angegebenen Methode behandelt. Quinacrin-Hydrochlorid wurde jedoch nicht in Puffer, sondern in Aqua dest. gelöst. Auch hier wiesen sich die Fibrozyten als die geeignetsten Zellen. Die Zahl der F-bodies variierte von 14 % - 25,9 % pro Präparat. Die Ausbeute an F-bodies ist für eine eindeutige Geschlechtsdiagnose zu gering.

b) Hauptversuch

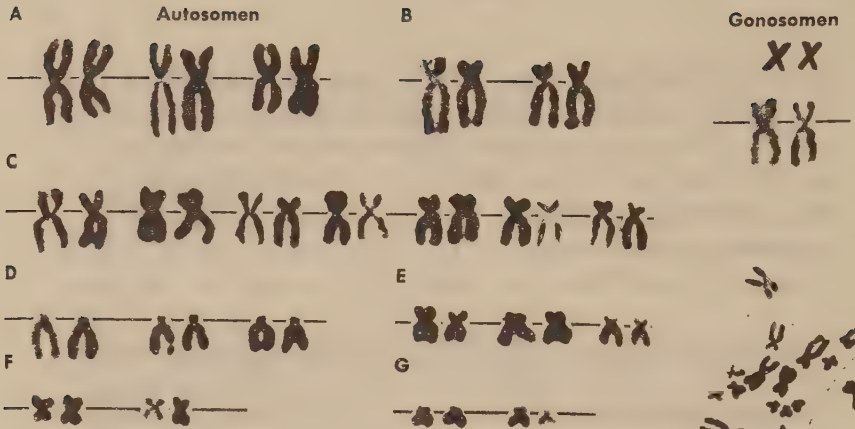
Bei der Untersuchung an postmortalem Gewebe des verstorbenen Neugeborenen wurde die Methode nach KHUHR

und BENIRSCHKE angewandt. In 3 Präparaten wurden je 50 Zellen ausgezählt, wobei sich ein mittlerer Anteil von 32 % F-bodies positiven Zellen zeigte. Einige dieser F-bodies zeichneten sich durch scharfe Konturen und intensive Fluoreszenz aus, so daß eine eindeutige Erkennung möglich war.

4.2.6 Untersuchung der Eltern des Neugeborenen A.

Die Schwangerschaftsanamnese der Mutter ergab folgendes: 1 1/2 Jahre vor der Schwangerschaft wurde eine Ovarialzystenoperation durchgeführt. Zu Beginn der Schwangerschaft hielt sich das Ehepaar 14 Tage lang in Ostafrika auf. Eine Nierenentzündung in der ersten Schwangerschaftswoche wurde mit Penicillin behandelt. Zudem nahm die Mutter Resochym und Mexaform. Ende des 2. Monats hatte sie Rötelnkontakt. Der später bestimmte Röteltiter war negativ. Im 3. Schwangerschaftsmonat machte die Mutter eine Pyelitis durch, die mit Penicillin therapiert wurde. Bis zum 6. Monat trat eine starke Hyperemesis auf, die mit einer Vitamin B 12-Spritze behandelt wurde. Die Mutter war keinen ionisierenden Strahlen ausgesetzt. Die Schwangerschaft verlief ohne Unfälle, Verletzungen und Blutungen. Bei der Ehe handelte es sich um eine Vetternehe 2. Grades.

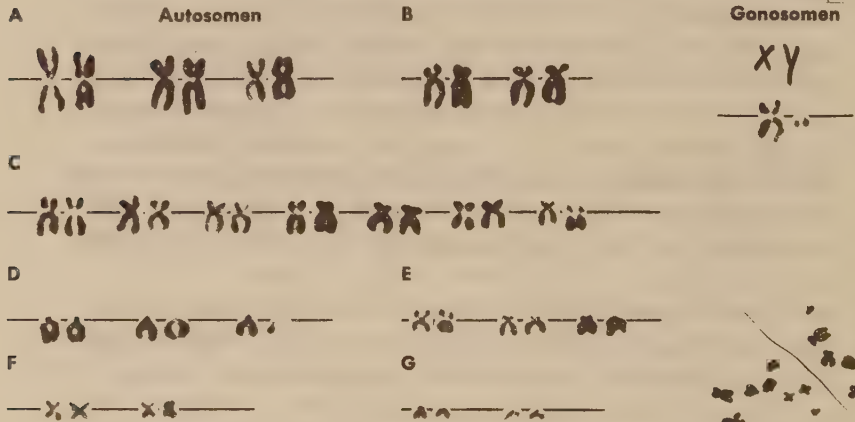
Die Chromosomenanalyse der Eltern ergab keinen Anhalt für eine Anomalie. Beim Vater fehlten bei 2 von 30 ausgezählten Mitosen je ein Chromosom der C und D Gruppe. Bei 2 von 30 ausgezählten Mitosen der Mutter fehlte je ein D und G Chromosom. Sonst waren die Chromosomenbilder, Zahl und Struktur unauffällig.



Film Agepe FF
Film-Nr. 59
Präparat-Nr. 249/73

Mit freundlichen Grüßen

Abb. 8: Chromosomenbefund der Mutter



Film Agepe FF
Film-Nr. 20
Präparat-Nr. 250/73

Mit freundlichen Grüßen

Abb. 9: Chromosomenbefund des Vaters

5. DISKUSSION

5.1 Ergebnisse des Screening

Die hier angewandte fluoreszenzmikroskopische Methode erlaubt eine rasche Identifizierung des männlichen Geschlechtschromosoms und ist somit als Pendant zur Bestimmung des weiblichen Geschlechtschromatins nach BARR und BERTRAM anzusehen.

CASPERSSON und Mitarbeiter nehmen an, daß sich das Quinacrin-Molekül in die DNA-Helix einschiebt und mit der basischen Seitenkette an die Phosphatgruppen in einer oder beiden DNS-Ketten bindet. PEARSON weist in diesem Zusammenhang auf den Zweiphasencharakter des Prozesses hin.

1. Quinacrin schiebt sich mit seinem tricyclischen Acridinkern in die DNA-Helix
2. Die Seitenkette bindet sich an einen Ort außerhalb der Helix.

Nach PEARSON ist die Seitenkettenbindung für das differenzierende Farbmuster der Chromosomen unabdingbar. Schon geringfügige Änderungen oder der Wegfall der Seitenkette führen zum Verlust der spezifischen Anfärbbarkeit.

Die in den Untersuchungen gefundene Häufigkeit der F-bodies in 74,7 % der Interphasenkernen männlicher Neugeborener entspricht den in der Literatur angegebenen Werten.

Die Tabelle 4 erlaubt einen Vergleich zwischen den Ergebnissen einiger Untersuchungsreihen.

A u t o r	Gewebe	F-body-positiv Zellkerne
GREENSHER et al.	Wharton'sche Sulze	75 %
MAJEWSKI et al.	Mundepithel	80 %
SCHWINGER et al.	Haarwurzel	16 - 64 %
HELLWEG-FRÜND et al.	Mundepithel	53 %
BARLOW-VOSA	Spermien	40,2 %
MAJEWSKI et al.	Lymphozyten	98,4 %
MAJEWSKI et al.	Leukozyten	97,3 %
PEARSON	Mundepithel	25 - 50 %
KHUDR, BENIRSCHKE	Amnionzellen	25 - 50 %
POLANI, MUTTON	Lymphozyten	35 - 44 %
ROBINSON	Mundepithel	67,4 %

Tabb. 4: Ergebnisse von zytogenetischen Untersuchungs-
serien an verschiedenem Gewebsmaterial

Wie aus der Tabelle ersichtlich, stimmt der in dieser Arbeit gefundene Wert mit dem von GREENSHER, der auch mit den Fibroblasten der Wharton'schen Sulze arbeitete, ermittelten recht genau überein.

Die F-bodies der analysierten Kerne variieren im Durchmesser von 0,25 Mikron - 1 Mikron. Die Größenunterschiede sind auf die von BOBROW et al. sowie SCHNEDL untersuchten Längenvariationen des Y-Chromosoms zurückzuführen.

Interessant ist die unterschiedliche Lage der F-bodies in verschiedenen Geweben. MAJEWSKI et al. beschreiben, daß sich der Y-spot in Lymphozyten ebenso häufig inner-

halb des Kern befand wie an der Kernkontur. Bei Leukozyten dagegen liegen die F-bodies etwa doppelt so häufig an der Kernkontur wie im Kerninnern. In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen der Fibroblasten wurden 77,83 % zentral gelegene und 18,88 % peripher gelegene F-bodies gefunden.

Bedenkt man, daß in 139 Zellen männlicher, dagegen nur in 9 Zellen weiblicher Neugeborener ein Duplex-Körperchen vorhanden war, ist anzunehmen, daß Doppelpunkte (Duplex) ein Äquivalent des Y-Chromosoms sind. Es kann sich dabei um die beiden langen Arme des Y-Chromosoms handeln. Dann würde sich der Kern am Ende der S-Phase oder in der G2-Phase des Zellteilungszyklus befinden, denn das Y-Chromosom verdoppelt sich relativ spät. Das einzelne F-body würde dann einen Kern anzeigen, der in der G1-Phase liegt und in dem sich die Chromatiden noch nicht repliziert haben (MAJEWSKI et al.).

Legt man die Theorie von MAJEWSKI zugrunde, dann müssen sich ähnlich wie die Leukozyten fast alle Fibroblasten in der G1-Phase befinden, denn nur 0,77 % der männlichen Kerne insgesamt zeigen Duplex-Körperchen.

HELLWEG-FRÜND et al. sowie MAJEWSKI fanden in Mundepithelkernen ca. 15 % Duplex-Körperchen, was eventuell in diesem Gewebe auf eine höhere Rate von Zellen in der G2-Phase schließen läßt.

Die Duplex-Körperchen zeigen in Interphasekernen manchmal auch ein dizentrisches Y-Chromosom an. Ebenso kann ein Doppelpunkt durch ein Isochromosom des langen Arms des Y-Chromosoms bedingt sein (BORGAKAR, HOLLANDER).

In den Zellen mit zwei oder mehr fluoreszierenden Punkten, 1,16 % der positiven Kerne, können autosomale Fluoreszenzen beteiligt sein. CASPERSSON et al. weisen darauf hin, daß das Chromosom Nr. 3 sowie Chromosomen aus der D und G-Gruppe in Interphasekernen eine dem F-body ähnliche Fluoreszenz zeigen, wenn auch in der Regel schwächer. Um autosomale Fluoreszenz dürfte es sich auch bei den Fibroblasten weiblicher Neugeborener handeln, in denen 1 oder mehrere F-body ähnliche fluoreszierende Punkte zu finden waren. Der Befund von 4,91 % positiver weiblicher Zellen entspricht dem in der Literatur angegebenen (HELLWEG-FRÜND et al., MAJEWSKI et al.).

In 6,7 % aller weiblicher Zellkerne waren mit der Atebrinfärbung barr-bodies nachweisbar. Die Größe der barr-bodies variierte, der Durchmesser bewegte sich in der Größenordnung von 1 - 3 Mikron. PELZ und MIELER haben angegeben, daß die Schwankungen auf Veränderungen des X-Chromatins im Verlauf des Zellzyklus zurückzuführen sind. Man findet die größten barr-Körperchen prämitotisch in der G2-Phase, die kleinsten postmitotisch in der G1-Phase.

Bei den Präparaten mit scholliger Chromatinstruktur wiesen nicht nur einzelne Zellen diese Erscheinung auf, sondern die stärkere Fluoreszenz einzelner Chromatinbereiche des Kerns war durchgängiges Merkmal bei allen Zellen. Das weist darauf hin, daß individuelle Nuancen in der Affinität bestimmter Chromatinbereiche zum Quinacrin-Hydrochlorid in Interphasekernen bestehen.

5.2 Diskussion des Falles A.

Unter den 366 untersuchten Fibroblastenabstrichen war ein Präparat, dessen auffälliger zytogenetischer Befund zur Entdeckung klinisch-pathologischer Merkmale führte. Das phänotypisch weibliche Neugeborene A. zeigte mit 37 positiven Zellen von 50 verwertbaren eine normale männliche Zellreihe. Da zur Verifizierung des Befundes kein Blut für die Chromosomenanalyse vorhanden war, bot sich die Untersuchung postmortalen Gewebes an. Die Ergebnisse dieser Untersuchung stützen die Untersuchungsergebnisse an den vitalen Zellen. Sicher kann man aus ihnen keinen Aufschluß über die tatsächliche Zahl von F-bodies in einer Zellreihe oder über eventuelle Mosaikkonstellationen erwarten. Ein großer Teil der Zellen aus postmortalem Gewebe ist pyknotisch oder zerstört. Die Ergebnisse bestätigen aber die Existenz des Y-Chromosoms mindestens in einigen Zellen des Neugeborenen A.

Interessant vom zytogenetischen Standpunkt aus ist der Sektionsbefund des Genitalbereichs. Die äußeren Genitale waren phänotypisch weiblich, der Uterus mäßig hypoplastisch, die Tuben normal angelegt. Die beiden Gonaden waren nur durch bindegewebige Stränge repräsentiert. Sieht man von den anderen Mißbildungen ab, die ein Überleben des Neugeborenen unmöglich machten, so bieten sich angesichts der gonadalen Dysgenese folgende Erklärungen an:

- a) Es handelt sich um ein Individuum mit XO/XY-Mosaik. GERMAN führt dazu aus, daß in einem solchen Fall je nach Anteil der XO- bzw. XY-Zelllinie am Mosaik von der Ausbildung von Testes (starke XY Präsenz) bis hin zum reinen Bindegewebsstreifen ("gonadal

streaks" bei schwacher XY Präsenz) aller Übergangsformen vorkommen können. Angesichts der Ausbildung einer reinen Gonadendysgenesie einerseits, und der großen Zahl männlicher F-bodies andererseits, ist daher ein XO/XY-Mosaik im Rahmen des Turner-Syndroms bei dem Neugeborenen A. unwahrscheinlich.

Hierbei ist vorauszusetzen, daß die Auszählung von 50 Zellen hinreichend Auskunft über eine Mosaikkonstellation gewährt.

- b) Eine testikuläre Feminisierung wäre bei der Kombination von männlichem Y-Chromatin einerseits und Ausbildung weiblicher äußerer Genitale andererseits denkbar. Da dann aber Uterus und Tuben fehlen und die Gonaden zu Testes differenziert sind, trifft diese Vermutung bei dem vorliegenden Befund des Kindes A. nicht zu.
- c) Während der heterochromatische Anteil des Y-Chromosoms in der phänotypischen Ausprägung scheinbar keine Rolle spielt, liegt in der Nähe des Centromers ein Chromatinbereich der für die Differenzierung der Testes verantwortlich ist (siehe 2.2.2.3). Es ist möglich, daß dieser Anteil z. B. durch Deletion verlorenggeht, oder eine funktionelle Anomalie aufweist. LUCAS und DEWHURST beschreiben zwei phänotypisch weibliche Individuen mit männlichem Karyotyp 46 XY und reiner Gonadendysgenesie. Ähnlich wie in diesen Fällen ist es auch bei dem Neugeborenen A. möglich, daß unbeschadet der normalen Fluoreszenz des F-bodies der Testis-differenzierende Anteil des Y-Chromosoms aus oben erwähnten Gründen nicht zur Auswirkung kam.

5.3 Kritik der Methode

Die hier angewandte Methode der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Fibroblasten der Wharton'schen Sulze zeichnet sich durch relativ geringen apparativen und zeitlichen Aufwand aus. Die in der Arbeit gesammelten Erfahrungen bestätigen den Hinweis von Greensher et al., daß der Vorteil von Zellkernen der Wharton'schen Sulze gegenüber anderen neonatalen Geweben im klaren Kernplasma der Größe (20 - 30 Mikron im Durchmesser) sowie der elliptischen oder runden Form liegen. PEARSON und SCHWINGER deuten auf die starke Beeinträchtigung durch bakterielle Verunreinigung bei Untersuchungen von Mundepithelabstrichen hin. In den Fibroblastenabstrichen wirkt sich die Verunreinigung durch Bakterien nur in wenigen Fällen so stark aus, daß die Geschlechtsdiagnose unmöglich wird.

Ein Nachteil liegt darin, daß in einem Teil der Präparate (17,8 %) die Zellen völlig disseminiert liegen. Es ist zeitraubend, die verstreuten Zellen zu suchen. In 52,1 % der Präparate lagen die Zellen so verteilt, daß der zeitliche Aufwand bei der Suche gering war. In 30,1 % waren Zellgruppen vorhanden, die ein schnelles Auszählen erlaubten. Sicher ist bei einem geschlossenen Gewebspräparat - etwa einem Amnionhäutchen - der zeitliche Aufwand noch geringer.

Man kann dem Screening von Kollektiven mit der F-body-Methode nicht das Prädikat absoluter Verlässlichkeit zusprechen. Es können Fehler durch Vorhandensein kleiner Y-Chromosomen mit fehlender Fluoreszenz (Bor-gaonkar), durch bakterielle Verunreinigung sowie durch autosomale Fluoreszenz auftreten.

Trotzdem stellt die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Interphasekernen in Kombination mit der Chromosomenanalyse ein wertvolles Hilfsmittel in der Suche nach gonosomalen Aberrationen dar. Möglichkeiten, die zum Teil bereits Eingang in die Praxis gefunden haben, bieten sich

- a) in der Geschlechtsbestimmung von Feten
- b) beim Nachweis des Y-Chromosoms in Spermien
- c) bei Untersuchungen über das Verhalten des Y-Chromosoms in der Mitose
- d) bei der Suche nach dem XYY-Karyotyp in größeren Kollektiven

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung von Interphasekernen auf Abstrichpräparaten von 366 Neugeborenen in der Zeit vom 1. Juli 1972 bis 31. März 1973 brachte Ergebnisse, die den in der Literatur angegebenen entsprechen. Die Methode, durch Anfärbung mit dem Acridinderivat Quinacrin-Hydrochlorid das Y-Chromosom in Interphasekernen von Fibroblasten darzustellen, kann mit geringfügigen Einschränkungen als zuverlässig bezeichnet werden.

Unter 366 untersuchten Neugeborenen befand sich eines, dessen zytogenetischer Befund in Zusammenhang mit der phänotypischen Ausprägung auf eine strukturelle Anomalie des Y-Chromosoms hinwies. Die Art der Anomalie konnte nicht durch eine Chromosomenanalyse geklärt werden, da das Kind kurz nach der Geburt verstarb. Die

Quote von 1 Geschlechtschromosomenanomalie auf 366 Fälle (0,27 %) entspricht in etwa dem von JAKOBS angegebenen Prozentsatz von 0,22 %, der in 5 auslesefreien Untersuchungsserien von Neugeborenen durch verschiedene Autoren als Mittelwert gefunden wurde.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ARRHIGI, F.E., HSU, T.C. Localisation of heterochromatin
in human chromosomes
Cytogenetics 10:81-86 (1971)
- BARLOW, P., VOSA, C.G. The Y-Chromosome in human
spermatozoa. Nature (Lond.)
226, 961 (1970)
- BARR, M. L.; BERTRAM, E.G. A morphological distinction
between neurons of the male
and female and the behaviour
of the nucleolar satellites
during accelerated nucleo-
protein synthesis
Nature 163, 676 (1949)
- BABROW, M.; PEARSON, P.L.;
VOSA, C.G. Technique for Identifying
Y Chromosomes in Human Inter-
phase Nuclei
Nature 226, 78 (1970)
- BORGAONKAR, D.S.;
HOLLANDER, D.N. Quinacrine Fluorescence of
the Human Y Chromosome
Nature 230, 52 (1971)
- BRITTEN, R.J.; KOHNE, D.E. Repeated Sequences in DNA
Science, 161, 529-540

CASPERSSON, T.; FARBER, S.; Chemical differentiation along
FOLEY, G.E.; KUDYNOWSKI, I.; metaphase Chromosomes.
MODEST, E.J.; SIMONSSON, E.; Exp. Cell. Res. 49, 219
WAGH, U.; ZECH, L. (1968)

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; Chemical Differentiation with
MODEST, E.J.; FOLEY, G.E.; Fluorescent Alkylating Agents
WAGH, U. and SIMONSSON, E. in Vicia Faba Metaphase
Chromosomes
Exp. Cell. Res. 58, 128-140
(1969)

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; DNA-Bindung Fluorochromes for
MODEST, E.J.; FOLEY, G.E.; the Study of the Organization
WAGH, U. and SIMONSSON, E. of the Metaphase Nucleus.
Exp. Cell. Res. 58, 141-152
(1969)

CASPERSSON, T.; ZECH, L. Differential Bindung of
and JOHANSSON C. Alkylating Fluorochromes in
Human Chromosomes
Exp. Cell. Res. 60, 315-319
(1970)

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; Fluorescent Staining of
JOHANSSON, C., LUIDSTEN, J. Heteropycnotic Chromosome
and HULTEN, M. Regions in Human Interphase
Nuclei
Exp. Cell. Res. 61, 472-474
(1970)

COHEN, M.M.; SHAW, M.W.; Racial differences in the
Mac Cluer, J.W. length of the human Y-Chromosome
Cytogenetics, 5, 34-52

- GERMAN, J. Abnormalities of human sex chromosomes. A unifying concept in relation to the gonadaldysgeneses
Clinical Genetics 1, 15 (1970)
- GREENSHER, A.; GERSH, R.; PEAKMAN, D. and ROBINSON, A. Screening of newborn infants abnormalities of the Y Chromosome
The Journ. of Pediatrics 79/2 305-306 (1971)
- HELLWEG-FRÜND, S.; KOSKE-WESTPHAL, T.; FUCHS-MECKE, S. and PASSARGE, E. Fluoreszenzmikroskop. Identifizierung von Anomalien des Y-Chromosoms
Deutsch Med. Wochenschrift 43, 1650-1661 (1972)
- HSU, T.C. Mammalian Chromosomes in vitro
1. The Karyotype of man.
Journal of Heredity 43, 167 - 172 (1952)
- JACOBS, P.A.; BRUNTON, M.; MELVILLE, M.M. Aggressive Behaviour, Mental Subnormality and the XYY male
Nature, 208, 1351-1352 (1965)
- JACOBS, P.A.; ROSS, A. Structural Abnormalities of the Y-Chromosome in Man
Nature, 210, 352-354 (1966)
- JACOBS, P.A. Excerpta Medica, Amsterdam
Human population cytogenetics
S. 232 - 242 aus: Human genetics, 1972, Proceedings of the fowith International Congr. of Hum. Gen.

- | | |
|---|--|
| KEMP, T. | Über das Verhalten der Chromosomen in den somatischen Zellen des Menschen. Zeitschrift für mikroskop.-anat. Forschung 16, 1-20 |
| KHUDR, G.; BENIRSCHKE, K. | Fluorescence of the Y-Chromosome: A rapid test to determine fetal sex
Am. J. Obstet. Gynecol. 110, 1091-1095 (1971) |
| MAJEWSKI, F.; BIER, L.;
PFEIFFER, R.A. | Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des menschlichen Y-Chromosoms in Interphasekernen durch Acridinderivate
Klin. Wschr. 49, 814-818 (1971) |
| MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.;
MELLMANN, W.J.;
BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. | Chromosome Preparations of Leucocytes Cultured from Human Peripheral Blood
Exp. Cell Res. 20, 613-616 (1960) |
| MULDAL, S.; OCKEY, C.H. | The "double male": a new chromosome constitution in Klinefelter's syndrome
Lancet, 2, 492 (1960) |
| MURKEN, J. D.; KUNZE, D. | Beitrag zu den cytogenetischen und klinischen Befunden beim XYY-Syndrom
Mschr. Kinderheilkunde 119 (1971) 366 - 368 |

- MURKEN, J.D.; WILMOWSKY, A.v Die Chromosomen des Menschen -
Die Geschichte ihrer Erforschung
S. 128
- NOVELL, P.C. Phytohaemagglut an initiator
of mitosis in cultures of
normal human leukocytes
Cancer Res. 20, 402 (1960)
- PAINTER, T.S. The Y-Chromosome in mammals
Science 53, 503-504 (1921)
- PAINTER, T.S. Studies in mammalian spermatogenesis: 2. The spermatogenesis
of man
Journ. of experimental Zoology
37, 291 - 336 (1923)
- PEARSON, P. The Use of New Staining
Techniques for Human Chromosome
Identification
Journ. of Med. Gen. 9,
264-274 (1972)
- PELC, S.R. Autoradiograph technique
Nature (Lond.) 160, 749-750
(1947)
- PELZ, L.; MIELER, W. Klinische Zytogenetik S. 46-48
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

- POLANI, P.E.; MUTTON, D.E. Y-Fluorescence of Interphase
Nuclei especially Circulating
Lymphocytes
Brit. Med. Journal 1, 138
(1971)
- SCHWINGER, E.; RAKEBRAND, E.; Y-Body in Hair Roots
MÜLLER, H.J.; BÜHLER, E.M.; Humangenetik 12, 79-80 (1971)
TETTENBORN, U.
- SERGOVICH, F.; VALENTINE, Chromosome Abberations in
G.H.; CHEN, A.T.L.; KINCH, 2159 Consecutive Newborn
R.A.H.; SMOUT, M.S. Babies
The New England Journ. of
Medicine 280, 851-854
(1969)
- TAYLOR, J.H. Sister Chromatid exchanges
in tritium-labeled chromosomes.
Genetics 43, 515-529 (1958)
- WINIWARTER, A.v. Etudes sur la spermato-
genèse humaine
Archives de Biologie 27,
91-189 (1912)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent
Dr. med. J. D. M u r k e n für die
freundliche Überlassung des Themas, Dis-
kussion und Korrektur der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. H. S p i e s s
danke ich für die Möglichkeit, an der
Kinderpoliklinik der Universität arbeiten
zu dürfen.

Den Angestellten des genetischen Labors,
besonders Fräulein R. F r a n k e n b e r g e r ,
sei gedankt für hilfreiche Ratschläge und
Anleitung bei praktischen Arbeiten.

LEBENS L A U F

Am 19. Dezember 1948 wurde ich, Friedrich Herbert Legiehn, in Philadelphia/Paraguay als Sohn des Missionars und Lehrers Hans Legiehn und seiner Ehefrau Agathe geboren.

Nach 4-jährigem Volksschulbesuch, teils in Brasilien, teils in der Bundesrepublik, wechselte ich im Jahre 1959 auf das Humanistische Gymnasium Bayreuth über. Nach zweimaligem Umzug legte ich im Juni 1968 die Reifeprüfung am Gymnasium Westerbürg ab.

Nach Immatrikulation im Sommersemester 1969 an der Universität Marburg erfolgte nach dem 2. Semester die naturwissenschaftliche und nach dem 5. Semester die ärztliche Vorprüfung. Nach 7 Semestern klinischen Studiums an der Universität München beendete ich das Studium im Dezember 1975 mit dem Staatsexamen.

